

川村学園女子大学研究紀要 第4巻 第2号 221頁—229頁 1993年

ストレス蛋白質 DnaK の機能

市 川 比良久

Cellular Function of a Stress Protein DnaK

Hiraku ITIKAWA

1. 緒言

外部環境の温度が生物に与える影響は測りしれないほど大きい。当然の事として生物は温度変化に対する防御方法を進化の過程で獲得してきた。そのあらわれが熱ショック応答 (Heat shock response) の機構である。この熱ショック応答は最初 Ritossa の発見¹⁾によって明らかになった。彼女はショウジョウバエの染色体パフ (不連続なふくらみ構造) が幼虫を熱ショックにさらしたときに、通常とは異なる位置に生ずることを見出した。パフは遺伝子の発現が行われている部分、つまり RNA 合成が盛んに行われているところである。

熱ショック応答は遺伝子発現の変化をもたらしばかりでなく、細胞の増殖や細胞骨格構造にも影響を及ぼすので熱ショックによって先ず生理的变化が起こると考えられる。一方おだやかな熱処理を前もって行くと細胞はその後の苛酷な熱ショックに対する抵抗性を獲得する。これは前処理によって遺伝子発現の変化がおこり熱ショック蛋白質 (以後熱ショックタンパク質と記す) の合成が起こり、この熱ショックタンパク質によって細胞の生理状態が著しく変化させられる。このような細胞の生理状態の変化と遺伝子発現の変化の間に認められる相互依存性の事実は基礎生物学の面から面白いだけでなく、最近抗癌治療法として注目されているハイパーサーミアの基礎研究の対象としても非常に重要と思われる。

現在地球上に生息する動物・植物・微生物を含む多種多様な生物の中で遺伝的・生化学的に最も研究が進んでいるのは大腸菌細胞であり、ヒトや酵母それにショウジョウバエの研究も盛んに行われている。生物の中で最も簡単な細胞構造をもつ大腸菌は分子生物学の研究対象として数多くの画期的研究に用いられている。大腸菌細胞も温度の急激な上昇によって20種類の熱ショックタンパク質を一時的に合成し、熱によっておこる種々の障害を克服しようとする²⁾。

いま対数増殖期の大腸菌を30°C から42°C に移すと5～10分後に熱ショックタンパクが急激につくられ、それから徐々に減少し30分後にもとの水準に戻って定常状態になる。大腸菌の熱ショックタンパク質の中で分子量69kDa(キロダルトン)のタンパク質がありこのタンパク質は熱ショック遺伝子の一つ *dnaK* 遺伝子からつくられるので、DnaK タンパク質とよばれている。このタンパク質は大腸菌の熱ショックタンパク質の中でも主要な役割を果たすものと考えられている。というのはこのDnaK タンパク質に良く似た熱ショックタンパク質(Hsp70と呼ばれる)が動物や植物・微生物を問わず広く生物界に見出されているからである³⁾。熱ショックタンパク質は熱ショックという一種のストレスによって合成されるのでストレスタンパク質の部類に属している。これら熱ショックタンパク質の機能は“分子シャペロン”として重要な役割を果たしている事が最近明らかになってきた⁴⁾。

本研究では、このDnaK タンパク質が細胞の増殖にどのような役割をもっているのかをしらべる目的で、私達がすでに分離した *dnaK* 遺伝子に変異をもつ *dnaK7* (Ts) 変異株を用いて次のような実験を行った。この *dnaK7* (Ts) 変異株は30°C, 40°C で成育できるが43°C で成育し得ない。43°C で成育できるような高温耐性の復帰株を9株分離し、これらの株について、DnaK タンパク質と他の2種の熱ショックタンパク質GroELおよびLonの合成量、さらに全株の増殖曲線を求めて、合成される3種の熱ショックタンパクの量と増殖との対応関係を探った。

2. 実験方法

用いた菌株は大腸菌B株の野生型H/r30RTでアルギニン要求性とチミン要求性をもっている。この野生型株から *dnaK* 遺伝子の変異 [*dnaK7* (Ts)] をもつ高温感受性(43°C で生育不能)のMT112株が分離されている⁵⁾。このMT112株から9株の高温耐性の復帰株MT21, MT22, MT23, MT24, MT25, MT26, MT27, MT28, MT29を分離し本研究に使用した。

熱ショックタンパク質の測定はすでに報告した操作^{6), 7)}に従って次のように行った。30°C で対数増殖期まで培養した細胞を [³⁵S]メチオニンを含む培地に移し、30°C, 40°C あるいは43°C で6分間培養した。次にこれらの [³⁵S]メチオニン標識細胞を集めてタンパク質を抽出し、電気泳動実験の試料とした。電気泳動はSDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて行い、泳動ゲルのオートラジオグラムを調製した^{8), 9)}。

熱ショックタンパク質の合成量は、オートラジオグラムを用いて島津2波長クロマトスキャナー(CS9301 DR-2)により、デンストメトリーを行って得た値から相対量を計算した。

増殖の測定は培養液の濁度(OD660)を光電光度計(日立 FPO-3)を用いて測定し、増殖曲線を求めた。

3. 結果と考察

(1) 各高温耐性復帰株 9 株の30°C, 40°C および43°C における DnaK, GroEL および Lon の各タンパク質の合成パターンがオートラジオグラムの結果から図 1, 2, 3, 4 のように示される。

野生株の H/r30RT 株では40°C と43°C で熱ショックタンパク質の DnaK, GroEL そして Lon が顕著に合成されている(図 1 の A2, A3)のに対して, *dnaK7* (Ts) 変異をもつ MT112株では, DnaK は殆どつくられずに GroEL が顕著に出現している(B2, B3)。9 株の高温耐性復帰株では, Lon タンパクの合成の高まりが多く見られるのが特徴である。

(2) 増殖の測定を H/r30RT 株, MT112株および復帰株 9 株について行った。それぞれを LB 培養液で 2 時間 30°C で培養した後, 43°C に温度を上げて培養し, 20分ごとに濁度(OD660)を測定し増殖曲線を得た結果が図 5 である。各株の増殖には差が見られ, 野生株 H/r30RT から最も増殖速度の遅い *dnaK* (Ts) 変異株の MT112株との間に復帰株の 9 株が次

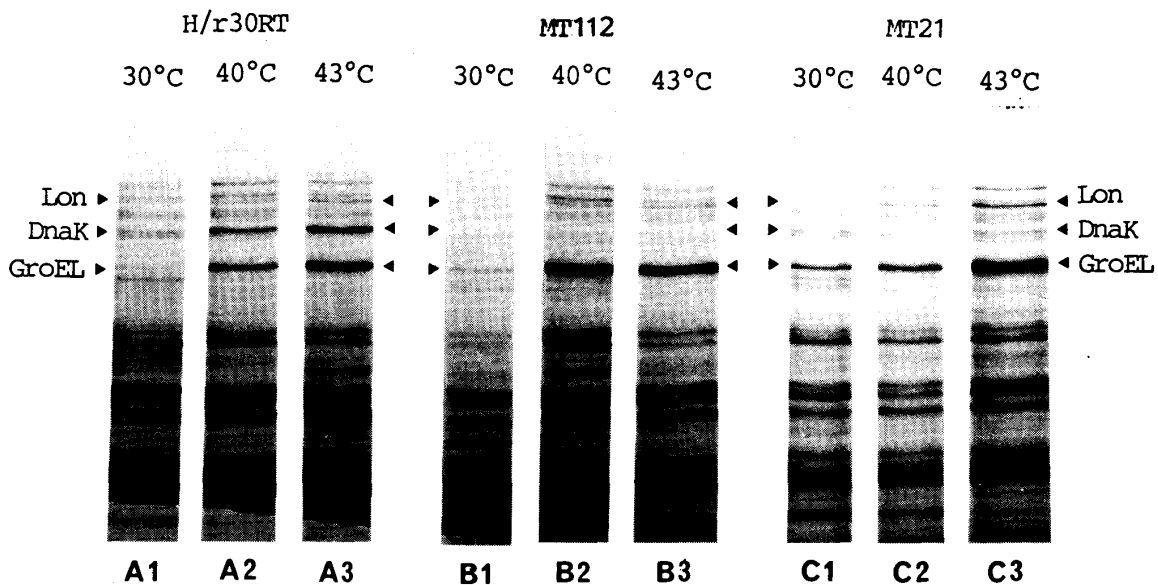


図 1. 大腸菌野生株(H/r 30RT), 高温感受性 *dnaK7*(Ts)変異株(MT 112)および高温耐性復帰株(MT 21)の30°C (A2, B2, C2)および43°C (A3, B3, C3)におけるタンパク質の合成パターン。▶印は熱ショックタンパク質の Lon (分子量 94kDa), DnaK (69 kDa) および GroEL (63 kDa) の位置を示す。

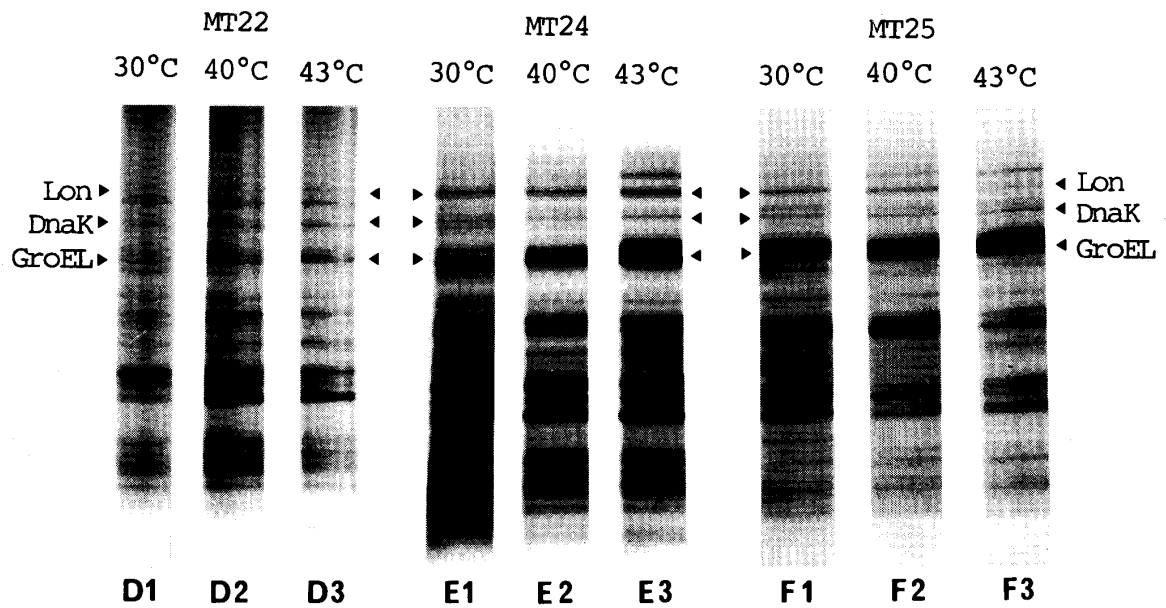


図2. 大腸菌 *dnaK7*(Ts) 変異株 (MT 112) より分離された高温耐性復帰株 MT 22, MT 24 および MT 25 の 30°C (D1, E1, F1), 40°C (D2, E2, F2) および 43°C (D3, E3, F3) におけるタンパク質合成パターンを示す。

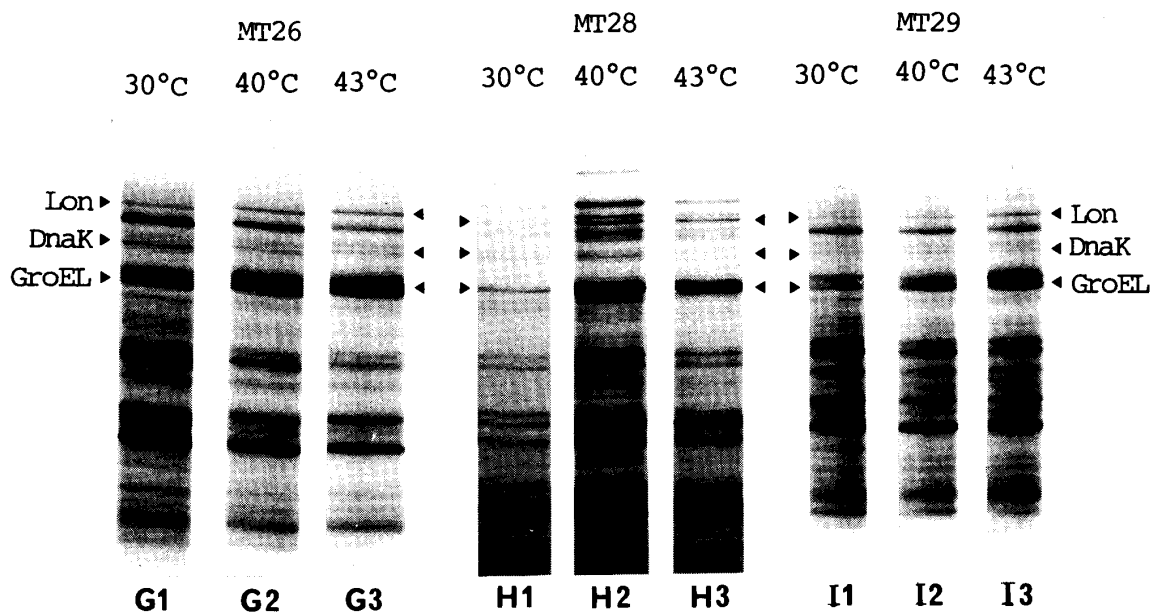


図3. 大腸菌 *dnaK7*(Ts) 変異株 (MT 112) より分離された高温耐性復帰株 MT 26, MT 28, および MT 29 の 30°C (G1, H1, I1), 40°C (G2, H2, I2) および 43°C (G3, H3, I3) におけるタンパク質合成パターンを示す。

ストレス蛋白質 DnaK の機能

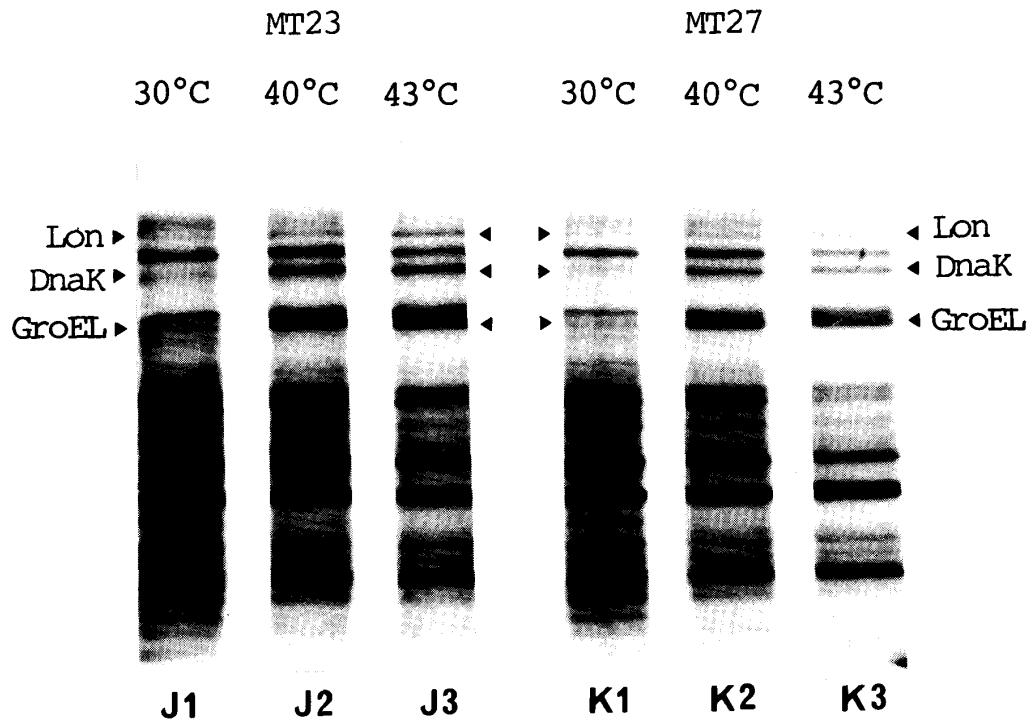


図4. 大腸菌 *dnaK7*(Ts)変異株(MT 112)より分離された高温耐性復帰株 MT 23 および MT 27の30°C (J1, K1), 40°C (J2, K2)および43°C (J3, K3)におけるタンパク質合成パターンを示す。

のように位置づけられる。すなわち, MT23, MT26, MT29, MT28, MT25, MT27, MT24, MT21そして MT22の順である。

(3) DnaK, GroEL, Lon 各タンパク質の合成量と増殖との関係を知るために, オートラジオグラムをデンストメトリー法によって分析し, 各タンパク質の量を求めた。親株 H/r30RT の30°Cにおける3種類のタンパク量をそれぞれ1として, 相対量を求めた。これを図に示したのが図6である。野生型の H/r30RT と変異株 MT112株の間に増殖の良い復帰株から増殖の遅い復帰株を左から右に順次並べてある。この結果を考察すると, 野生株の H/r30RT株では, 43°Cにおける合成率が GroEL : DnaK : Lon = 5 : 3 : 1 になっている。一方 *dnaK*(Ts) 変異株ではこの比が 8 : 0.4 : 1 であり, DnaK が明らかに少なく, 逆に GroEL が増加しているのが認められる。単純に考察すると, GroEL の増量は高温感受性を消去するのに役立っていないことがわかる。一方, 復帰株では Lon の合成が多く見られている。Lon タンパクの合成が少い唯一の復帰株の MT27の GroEL : DnaK : Lon の比は 8 : 2 : 1 であり, 野生株に見られる比率にはほぼ近い値を示している。図6の結果から, 不完全な DnaK の機能

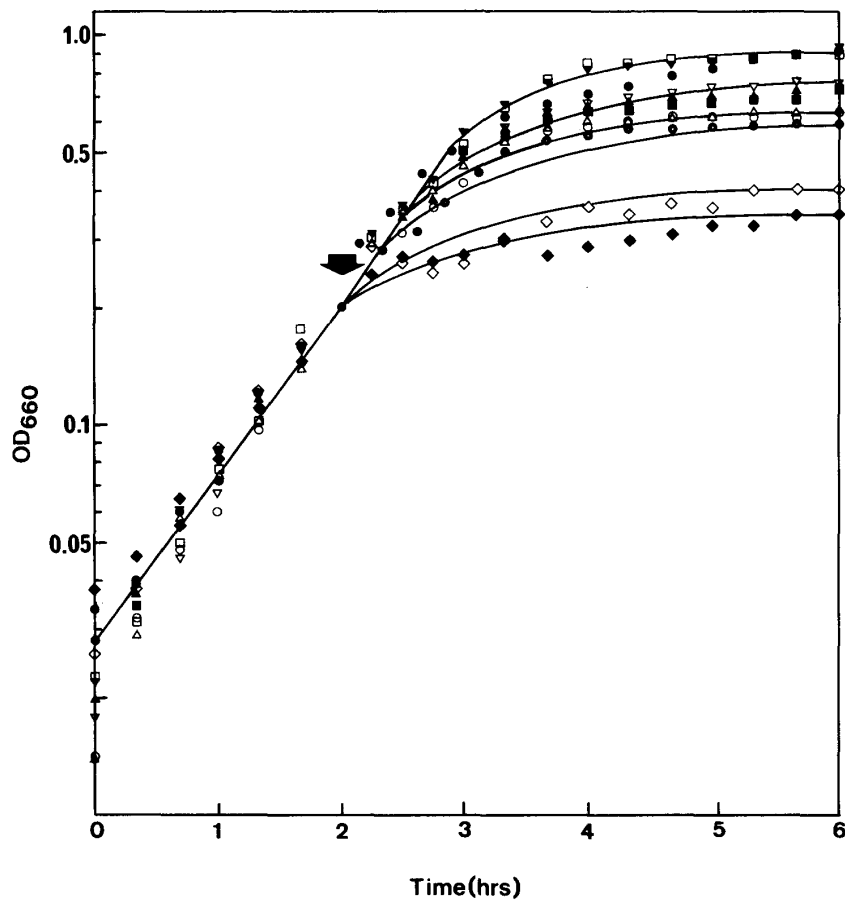


図 5. 大腸菌 H/r 30 RT 株, MT 112 株および高温復帰株 9 株の 30°C および 43°C における増殖曲線。合計 11 株の細胞を液体培地 LB で 30°C 2 時間培養した後 43°C に温度を上げて(矢印)さらに培養を行った。細胞の増殖のキネティクスは 20 分間ごとに OD 660 を測定して求めた。

- | | | |
|-------------|---------|----------|
| ● H/r 30 RT | ▲ MT 25 | ◇ MT 22 |
| □ MT 23 | ⊙ MT 27 | ◆ MT 112 |
| ▼ MT 26 | ⊗ MT 24 | |
| ▽ MT 29 | △ MT 21 | |
| ■ MT 28 | | |

縦軸は OD 660 (濁度) の $-\log T$ の値, 横軸は時間目盛である。

が補われるためには Lon タンパクがより多く合成される必要があるらしい。しかし Lon 以外にも DnaK の機能を補う因子がある可能性は否定できない。

Lon タンパク質は分子量 94kDa の熱ショックタンパク質であり, ATP をエネルギー源として働くタンパク質分解酵素活性をもっている^{10), 11)}。さらに Lon タンパクは DNA 複製が完了しない細胞が分裂して不完全な娘細胞を作らぬように細胞分裂を抑える働きもある。

ストレス蛋白質 DnaK の機能

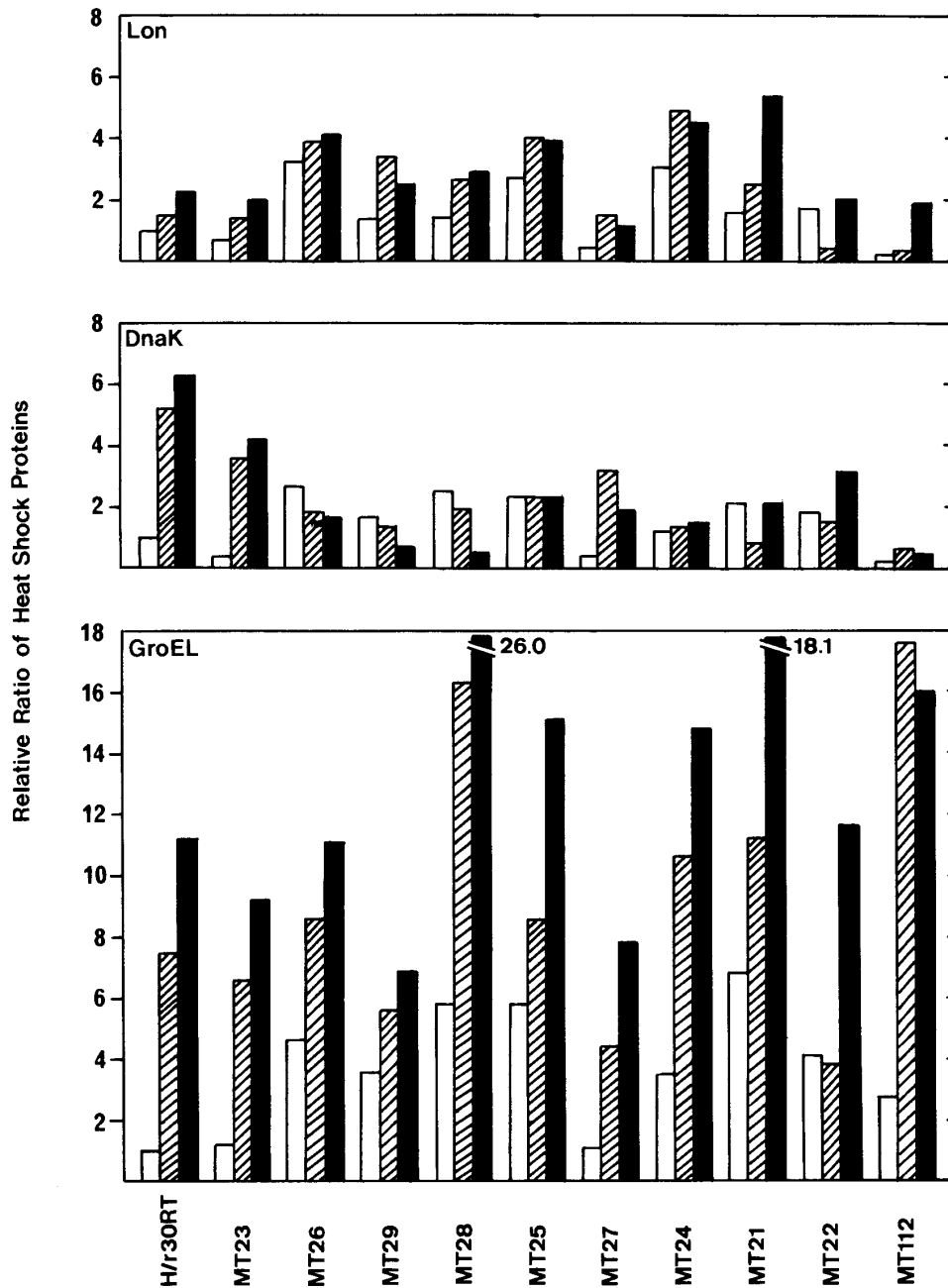


図 6. 大腸菌野生株, *dnaK*変異株および高温耐性復帰株の30°C, 40°C および43°C における Lon, DnaK および GroEL 各タンパクの合成量を求め, 30°C における野生株 (H/r 30 RT) の値をそれぞれ1として相対量を計算し, 棒グラフを作成した。

白ぬきの棒線 () : 30°C における合成量
 斜線入りの棒線 () : 40°C における合成量
 黒い棒線 () : 43°C における合成量
 縦軸は合成量, 横軸は使用菌株を示す。

本研究で得られた結果から DnaK タンパク質の機能と Lon タンパク質増加の関連性を論議する必要がある。DnaK タンパクの欠損によって細胞は43°C で DNA と RNA 合成を停止する⁵⁾。正常に DNA をもたない細胞が分裂して不完全で致死的な娘細胞をつくらぬように Lon タンパクが野生型細胞より多く必要となる。最近 DnaK の機能については、分子シャペロンとして働くことが示唆されとい⁴⁾。分子シャペロンとは、細胞で合成されたタンパク質がその機能を発揮するのに正しい折り畳み(正常な高次構造の形成)やほかのタンパク質との複合体形成(アセンブリー)、タンパク質の安定化などに働く介添タンパクの事である。シャペロンは自らは機能的要素として働かず合成タンパク質が最終的に機能的構造体を形成するのを助けるのである。熱ショックによって細胞内では複合体形成が阻害されたり、複合体が異常な形態をとって機能できなくなる事や、所定の位置に輸送されず機能を発揮できぬ場合等々が生ずる。このようなとき、再生不能な複合体の処理や不活性のタンパク質の処理が極めて重要なことになる。とくに DnaK タンパク質が欠損している細胞では顕著に異物が生ずるであろう。したがって、これらの不活性の異物タンパク質を多量に処理するために Lon タンパク質を大量に合成する必要が予想されるのである。

4. 要約

大腸菌の主要な熱ショックタンパク質の DnaK の機能を探るために *dnaK*(Ts) 変異をもつ MT112株から43°C で増殖可能となった復帰株 9 株を分離した。これらの復帰株について30°C, 40°C および43°C における熱ショックタンパク質 GroEL, DnaK, それに Lon の合成パターンをしらべ、さらにそれぞれの合成量を求めた。一方すべての株について、30°C と43°C における増殖曲線を求めた上で、上記3種の熱ショックタンパク質の合成量との比較検討を行った。

その結果、43°C で増殖できるようになった復帰株では Lon タンパクの合成量の高まりが観察され、Lon タンパク質が DnaK の欠損を補うのに有効であるとの結果を得た。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり終止協力頂いた東京都立大学理学部生物学教室の藤田弘博士ならびに田中真悟氏に深く感謝申し上げます。

6. 引用文献

- 1) Ritossa, F. *Experimentia* 18, 571–573 (1962)
- 2) Neidhardt, F. C., VanBogelen, R. A. and Vaughn, V. *Annu. Rev. Genet.* 18, 295–329 (1984)
- 3) Bardwell, J. C. A. and Craig, E. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 848–852 (1984)
- 4) Ellis, J. *Nature* 328, 378–379 (1987)
- 5) Itikawa, H. and Ryu, J.-I. *J. Bacteriol.* 138, 339–344 (1979)
- 6) Itikawa, H., Fujita, H. and Wada, M. *J. Biochem.* 99, 1719–1724 (1986)
- 7) Miyazaki, T., Tanaka, S., Fujita, H. and Itikawa, H. *J. Bacteriol.* 174, 3715–3722 (1992)
- 8) Itikawa, H., Wada, M., Sekine, K. and Fujita, H. *Biochimie* 71, 1079–1087 (1989)
- 9) Itikawa, H., Mishima, Y., Wada, M. and Fujita, H. *Jpn. J. Genet.* 67, 17–27 (1992)
- 10) Charette, M., Henderson, F. and Markowitz, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4728–4732 (1981)
- 11) Chung, C. H. and Goldberg, A. L. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78, 4931–4935 (1981)